

UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE FARINHAS INFESTADAS
POR ÁCAROS**

Patrícia Vogel

Lajeado, janeiro de 2018

Patrícia Vogel

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE FARINHAS INFESTADAS POR ÁCAROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Universidade do Vale do Taquari - Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia Agroalimentar, linha de pesquisa Biotecnologia na Produção Primária de Alimentos.

Orientador: Dr. Noeli Juarez Ferla

Co-orientadora: Dra. Lucélia Hoehne

Lajeado, janeiro de 2018

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Tyrophagus putrescentiae</i>	13
Figura 2 – Funil de Berlese	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquema das análises	21
Tabela 2 - Parâmetros analíticos para digestão de farinhas em forno micro-ondas	26

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	3
LISTA DE TABELAS.....	4
SUMÁRIO	5
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Delimitação do tema	8
1.2 Problema	9
1.3 Hipótese.....	9
1.4 Objetivos.....	9
1.4.1 Objetivo geral.....	9
1.4.2 Objetivos específicos	9
1.5 Justificativa	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Ácaros de produtos armazenados	11
2.1.1 Prevalência no Brasil	12
2.1.2 <i>Tyrophagus putrescentiae</i>	13
2.2 Qualidade de produtos armazenados	15
2.3 Saúde humana e animal	16
2.4 Macronutrientes.....	17
2.5 Micronutrientes	18
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	19
3.1 Criação estoque de <i>Tyrophagus putrescentiae</i>	19

3.2 Preparo das amostras.....	20
3.3 Análise de macronutrientes.....	22
3.3.1 Umidade.....	22
3.3.2 Resíduo por incineração ou cinzas	23
3.3.3 Lipídios.....	24
3.3.4 Proteínas.....	24
3.3.5 Carboidrato	25
3.4 Análise de micronutrientes	25
3.4.1 Espectrometria de Absorção Atômica	26
3.5 Análises estatísticas.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Artigo.....	29
REFERÊNCIAS.....	35

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE FARINHAS INFESTADAS POR ÁCAROS

1 INTRODUÇÃO

Existem cerca de 48 mil espécies de ácaros e carrapatos (Acari) descritos na literatura (HARVEY, 2002), entretanto, acredita-se que o número de espécies não conhecidas é cerca de 20 vezes maior que as espécies já descritas (WALTER; KRANTZ, 2009). Os ácaros originalmente habitavam o solo e com o passar do tempo migraram para habitats humanos, sendo classificados em dois grupos: de poeira doméstica e de produtos armazenados (HUGHES, 1976; OCONNOR, 1979). Aqueles associados a poeira doméstica se alimentam basicamente de tecidos humanos mortos, pêlos de animais, fungos, bactérias e pólen de plantas. São encontrados em tapetes, cortinas, estofados, colchões, roupas de cama e travesseiros presentes em ambientes domésticos. Podem causar afecções respiratórias como asma e rinite alérgica no homem (NADCHATRAM, 2005). Aqueles associados a produtos armazenados foram relatados em produtos alimentícios como grãos (trigo, trigo sarraceno, milho, aveia, arroz, cevada) e seus derivados (farelos, farinhas, etc.) (CHMIELEWSKI, 1999; FRANZOLIN; BAGGIO, 2000; SOUSA et al., 2005; PALYVOS; EMMANOUEL; SAITANIS, 2008; STEJSKAL; HUBERT, 2008), cereais processados (THIND; CLARKE, 2001), leguminosas como feijão (FRANZOLIN; BAGGIO, 2000; SOUSA et al., 2005), ração para animais (BRAZIS et al., 2008; GILL et al., 2011;

HIBBERSON; VOGELNEST, 2014), carnes e peixes secos (ABBAR et al., 2016), cogumelos (QU et al., 2015), presunto (GARCÍA, 2004), frutas secas (TAO et al., 2015), queijos (AYGUN; YAMAN; DURMAZ, 2007), leite em pó (HO, 1996) e chocolate (FLECHTMANN, 1986). As espécies mais comuns já identificadas nos estudos são *Acarus siro* L., *Acarus farris* Oudemans, *Lepidoglyphus destructor* (Schrank), *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) e *Tyrophagus longior* (Gervais) (SINHA, 1979; HUBERT et al., 2006; PALYVOS; EMMANOUEL, 2006; PALYVOS; EMMANOUEL; SAITANIS, 2008). Quando a infestação acarina é alta em determinado produto, a qualidade do mesmo fica comprometida podendo ser percebida pela redução na taxa de germinação de sementes (SOLOMON, 1946; SOLOMON, 1969; SINHA, 1979) e pela perda nutricional dos grãos (KRANTZ, 1955), apesar da extensão do dano nutricional ainda não ser conhecida. Estas infestações causam perdas econômicas importantes (WILKIN; STABLES, 1985), como por exemplo no Reino Unido, onde estima-se perda de pelo menos 1 milhão de libras esterlinas por ano com grãos e derivados infestados por ácaros (HOOK, 2004).

Na espécie humana, além da sensibilização cruzada com ácaros da poeira doméstica (ARLIAN et al., 2009; LIAO et al., 2010; POSTHUMUS; BORISH, 2012), os ácaros de produtos armazenados podem causar asma, rinite alérgica, urticária e dermatite de contato em agricultores e trabalhadores de indústrias e padarias (REVSBECH; DUEHOLM, 1990; ARMENTISA et al., 1994; STORAAS et al., 2005; ESTÉVEZ, 2006; STEJSKAL; HUBERT, 2008). Em casos graves a ingestão de alimentos preparados com farinhas infestadas por ácaros pode desencadear anafilaxia (ERBEN et al., 1993; POSTHUMUS; BORISH, 2012; SANCHEZ-BORGES et al., 2013; TAKAHASHI et al., 2014; BARRERA et al., 2015).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é caracterizar as alterações físico-químicas nos macronutrientes e micronutrientes de cereais infestados por *Tyrophagus putrescentiae* em um período de nove meses.

1.1 Delimitação do tema

Considerando a grande riqueza acarina e de produtos armazenados infestados por eles, delimitamos o presente estudo escolhendo uma espécie de ácaro *Tyrophagus putrescentiae* e como produtos armazenados escolhemos os cereais trigo, milho e aveia, produtos primários muito utilizados na alimentação humana e animal, e que na forma de farinha são matéria prima de um grande número de produtos alimentícios.

1.2 Problema

A presença de ácaros em cereais provoca diminuição da qualidade nutricional?

1.3 Hipótese

Ácaros presentes em cereais como trigo, milho e aveia diminuem o valor nutricional de macro e micronutrientes.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo geral

- Caracterizar as alterações nos macronutrientes e micronutrientes em cereais como trigo, milho e aveia infestados e não infestados por *Tyrophagus putrescentiae* num período de nove meses.

1.4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a infestação de *Tyrophagus putrescentiae* em amostras de farinhas de trigo, milho e aveia num período de nove meses;

- Quantificar a umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, carboidratos, ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) em amostras de farinha de trigo, milho e aveia infestados e não infestados por *Tyrophagus putrescentiae* num período de nove meses;
- Comparar as alterações nos macronutrientes e micronutrientes avaliados em amostras de farinha de trigo, milho e aveia infestados e não infestados por *Tyrophagus putrescentiae* num período de nove meses.

1.5 Justificativa

O cultivo de grãos no Brasil ocupa aproximadamente 56 milhões de hectares com produção anual de 191,6 milhões de toneladas, sendo 8,5 milhões de hectares e 28,8 milhões de toneladas no estado do Rio Grande do Sul (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014), ou seja, é uma atividade importante no contexto econômico do estado e do país. Entretanto, os ácaros são capazes de infestar grãos como trigo, trigo sarraceno, milho, aveia, arroz e cevada, além de outros produtos alimentícios (CHMIELEWSKI, 1999; FRANZOLIN; BAGGIO, 2000; SOUSA et al., 2005; HUBERT et al., 2006; PALYVOS; EMMANOUEL; SAITANIS, 2008; STEJSKAL; HUBERT, 2008). A infestação acarina causa perda de qualidade percebida pela redução na taxa de germinação das sementes (SOLOMON, 1946) e perda nutricional (KRANTZ, 1955) embora a extensão do dano não seja conhecido.

Somando à perda da qualidade dos grãos, os ácaros de produtos armazenados podem desencadear reações alérgicas no homem tais como asma, rinite, urticária, dermatite de contato e anafilaxia através da inalação, contato ou ingestão de ácaros vivos ou mortos, subprodutos do metabolismo ou fezes (SINHA, 1979). O desencadeamento de reações alérgicas em agricultores, trabalhadores de padarias e unidades de armazenamento de grãos é comum (REVSBECH; DUEHOLM, 1990; ARMENTISA et al., 1994; STORAAS et al., 2005; ESTÉVEZ, 2006; STEJSKAL; HUBERT, 2008). Além disso, a sensibilização a ácaros de produtos armazenados é

mais frequente em indivíduos alérgicos à ácaros da poeira doméstica, no qual a prevalência no Brasil é de 34 e 19,1% para *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) e *Dermatophagoides farinae* Hughes, respectivamente (BALDAÇARA et al., 2015). Estima-se também, que a incidência de episódios de anafilaxia seja em torno de 0,5 a 2%, sendo a maioria pela ingestão de cereais contaminados por ácaros e seus alergênicos (POSTHUMUS; BORISH, 2012). Sendo assim, é importante elucidar a perda nutricional ocorrida pela infestação de ácaros em grãos e seus derivados, uma vez que estes são a base da alimentação da população brasileira, caracterizando as reações alérgicas decorrentes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ácaros de produtos armazenados

Os ácaros de produtos armazenados são assim denominados por estar comumente associados a unidades de armazenamento de grãos (HUGHES, 1976; OCONNOR, 1979), apesar de ocupar todos os ecossistemas acessíveis à vida animal, adotando comportamento alimentar variável passando por fungivoria, fitofagia, parasitismo e predatismo (MORAES; FLECHTMANN, 2008).

De acordo com o comportamento alimentar são divididos em primários (Acaridida), que se alimentam diretamente dos produtos armazenados; secundários (Gamasida e Actinedida), que compreendem os predadores e parasitos e, os terciários (Actinedida, Acaridida, Gamasida e Oribatida), que são micófagos (KRANTZ, 1961). Em geral, os ácaros que habitam os depósitos e unidades de armazenamento de grãos seguem uma ordem cronológica de infestação, ocorrendo inicialmente os primários, depois os secundários e por fim os terciários (BAGGIO et al., 1987).

O ambiente artificial criado pelos depósitos e unidades de armazenamento de grãos favorece o desenvolvimento de diversas espécies acarinas, visto que a proteção contra extremos de temperatura permite a alimentação abundante e reprodução durante todo ano (FLECHTMANN, 1986). Desta forma, as condições de

armazenamento podem favorecer o desenvolvimento de ácaros, estando diretamente relacionado, entre outros fatores, com o grau de limpeza dos depósitos e unidades de armazenamento, umidade relativa do ar, temperatura e infestação por outras pragas como insetos e roedores. Mas também, cabe ressaltar, que condições sanitárias adequadas bem como o controle de temperatura e umidade do ar podem controlar infestações (LORINI, 1998).

As espécies acarinas de produtos armazenados mais comuns já identificadas são *Acarus siro*, *Acarus farris*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae* e *Tyrophagus longior* (SINHA, 1979; HUBERT et al., 2006; PALYVOS; EMMANOUEL, 2006; PALYVOS; EMMANOUEL; SAITANIS, 2008).

2.1.1 Prevalência no Brasil

Não existem muitos estudos sobre prevalência de ácaros em produtos armazenados no Brasil. Um dos primeiros trabalhos que avaliou a presença de ácaros foi desenvolvido por Bagio e colaboradores (1987) com 160 amostras de cereais como arroz, feijão, milho, trigo, aveia, ervilha e sorgo adquiridos de grandes distribuidores de cereais e de mercados/armazéns na grande São Paulo. Este estudo revelou que 49% das amostras apresentaram ácaros, sendo que 48% estavam contaminadas com *Tyrophagus putrescentiae*, 17,5% com *Aleuroglyphus ovatus* (Troupeau), 6,8% com *Glycyphagus domesticus* (DeGeer), 4,37% com *Chortoglyphus arcuatus* (Troupeau), 3,8% com *Suidasia pontifica* (Oudemans), 3,12% com *Blomia tropicalis* (Bronswijck, Cook & Oshima), 1,25% com *Histiostoma sp.* e *Dermatophagoides pteronyssinus*. Além disso, os pesquisadores observaram maior prevalência de ácaros nas amostras obtidas em mercados/armazéns, onde a rotatividade do estoque é menor, do que nas amostras provenientes de grandes distribuidores (BAGGIO et al., 1987). Arroz polido e feijão adquiridas em feiras livres de São Paulo, e incubados por 28 dias em estufa à 25 °C e 75% umidade relativa do ar apresentaram ácaros em 31,7% das amostras. Diferentemente, aos 42 dias no laboratório à 21,5-22,5 °C e 73,5-74,5% umidade relativa do ar, 6,9% das amostras continham ácaros (FRANZOLIN; BAGGIO, 2000).

Estes dados sugerem que, apesar das amostras não apresentarem ácaros adultos, possivelmente estavam contaminadas com ovos de ácaros quando armazenados. As amostras de arroz polido tinham mais ácaros que as amostras de feijão e a espécie predominante neste estudo também foi *Tyrophagus putrescentiae*. O estudo mostrou também que durante a primavera e verão há uma maior incidência destes ácaros em produtos armazenados, demonstrando que a temperatura e umidade relativa do ar são fatores determinantes, e, portanto, devem ser observados em estruturas de armazenamento de grãos. Além disso, os autores concluem que quanto maior o período de armazenamento, maior a presença de ácaros.

Outro estudo avaliando a acarofauna na região nordeste do Brasil em feijão, milho e ração para animais adquiridos em supermercados e feiras livres da cidade de Recife mostrou que dentre os ácaros primários, *Suidasia medanensis* (Oudemans) foi predominante (3.035 indivíduos), seguida de *Caloglyphus hughesi* (Samsinak) (436 indivíduos), *Caloglyphus oudemansi* (Zachvatkin) (422 indivíduos) e *Tyrophagus putrescentiae* (250 indivíduos). Dentre os secundários, *Metapronematus* sp. foi predominante (3.417 indivíduos), seguido de *Tarsonemus granarius* (Lindquist) (3.003 indivíduos), *Cheyletus* spp. (465 indivíduos) e *Blattisocius keegani* (Fox) (253 indivíduos). A riqueza foi maior dentre os ácaros secundários (dezesesseis espécies), que os primários (oito espécies) (SOUSA et al., 2005).

2.1.2 *Tyrophagus putrescentiae*

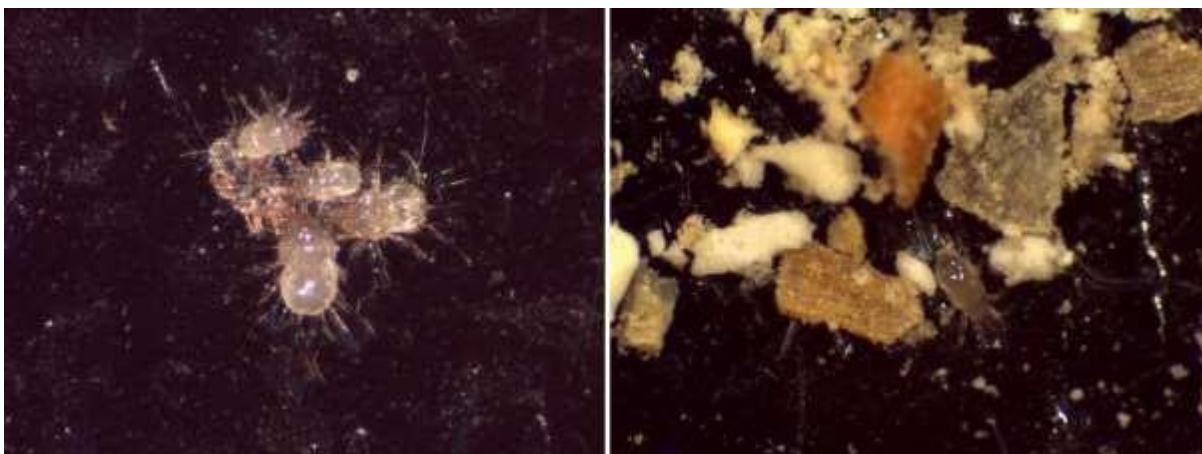
Tyrophagus putrescentiae é considerado uma das principais pragas de produtos armazenados (COLLINS, 2012). São classificados na ordem Sarcoptiforme, subordem Acaridiae (Latreille, 1802) e família Acaridae (Ewing e Nesbitt, 1954) (FLECHTMANN, 1985).

Possui distribuição cosmopolita, sendo relatado em um grande número de países, como por exemplo, Austrália (HIBBERSON; VOGELNEST, 2014), Brasil (BAGGIO et al., 1987), China (TAO et al., 2015), Grécia (PALYVOS; EMMANOUEL;

SAITANIS, 2008), República Checa (HUBERT et al., 2006) e Turquia (AYGUN; YAMAN; DURMAZ, 2007), apesar de ser mais comum em países tropicais e subtropicais (HUGHES, 1976). A preferência por ambientes mais quentes e úmidos foram confirmadas em estudos recentes (ASPALY et al., 2007; SÁNCHEZ-RAMOS; ÁLVAREZ-ALFAGEME; CASTANERA, 2007; HUBERT et al., 2010) que mostraram que esta espécie possui metabolismo ativo entre 0,8 a 48,1 °C, sendo a temperatura ótima em torno de 32 °C (HUBERT et al., 2010) e que o limiar superior de atividade é 49 °C (ASPALY et al., 2007). A umidade relativa do ar afeta o crescimento, a fecundidade e a sobrevivência da espécie. Com 70% de umidade *Tyrophagus putrescentiae* não foi capaz de colocar ovos. No entanto, a oviposição aumentou quando a umidade foi aumentando para 80% revelando que a taxa de crescimento ótimo fica entre 70 e 80% de umidade relativa do ar à temperatura constante de 25 °C (SÁNCHEZ-RAMOS; ÁLVAREZ-ALFAGEME; CASTANERA, 2007). Estes estudos explicam a preferência de *Tyrophagus putrescentiae* por países mais quentes e úmidos, a exemplo do Brasil. E também, a predominância em São Paulo, mas não no Recife, onde a umidade relativa do ar é menor.

Além disso, é generalista, sendo encontrado nos mais diversos habitats como grãos e cereais (trigo, trigo sarraceno, milho, aveia, arroz e cevada) (CHMIELEWSKI, 1999; FRANZOLIN; BAGGIO, 2000; SOUSA et al., 2005; HUBERT et al., 2006; PALYVOS; EMMANOUEL; SAITANIS, 2008; STEJSKAL; HUBERT, 2008), cereais processados (THIND; CLARKE, 2001), leguminosas como feijão (FRANZOLIN; BAGGIO, 2000; SOUSA et al., 2005), cogumelos (QU et al., 2015), presunto (GARCÍA, 2004), ração de animais (SOUSA et al., 2005; NAYAK, 2006; BRAZIS et al., 2008; GILL et al., 2011; HIBBERSON; VOGELNEST, 2014), chocolate (FLECHTMANN, 1986), frutas secas (BAGGIO et al., 1987; TAO et al., 2015) e queijos (AYGUN; YAMAN; DURMAZ, 2007). Sabe-se também que têm preferência por alimentos com alto teor de proteína e lipídeo (HUGHES, 1976; DUEK et al., 2001; AYGUN; YAMAN; DURMAZ, 2007; ERBAN; RYBANSKA; HUBERT, 2015).

Figura 1 - *Tyrophagus putrescentiae*



Fonte: da SILVA, G. L. et al. (2016)

2.2 Qualidade de produtos armazenados

Apesar do avanço da ciência e de estudos relacionados a ácaros de produtos armazenados, sabe-se pouco sobre as implicações de uma infestação de ácaros na qualidade de produtos armazenados principalmente pela diversidade acarina e diversidade de substratos dos quais se alimentam.

Em relação a ácaros que infestam grãos e derivados, é importante considerar que, apesar da ocorrência de grande número de espécies em diferentes partes do mundo, poucas são capazes de causar infestações com danos visíveis a olho nu (PACHECO; PAULA, 1995). Isso ocorre porque os ácaros são pequenos e não precisam de uma grande quantidade de alimento para sobreviver. Em condições favoráveis de temperatura e umidade os ácaros consomem até 3% do peso do grão de trigo no período de seis meses (SOLOMON, 1946).

Mesmo que a perda de peso do grão não seja significativa, observou-se redução na taxa de germinação das sementes devido ao consumo do gérmen do trigo por tiroglífídeos (SOLOMON, 1946; SOLOMON, 1969; SINHA, 1979) e redução na qualidade nutricional dos grãos principalmente em relação a vitaminas do complexo B e de ferro por estarem concentradas nos locais preferencialmente consumidos pelos ácaros (KRANTZ, 1955). No entanto, não existe nenhum estudo que tenha mensurado a perda de carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e minerais, dos grãos ocasionado pela ação de ácaros.

A legislação brasileira estabelece uma tolerância de insetos e artrópodes em alimentos com o objetivo de manter um padrão e garantir a qualidade dos produtos. Entretanto, esta legislação não cita um limite para ácaros em produtos armazenados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014). Mesmo assim, sabe-se que existe relação cruzada entre ácaros de produtos armazenados e ácaros da poeira doméstica, e que, um grande número de brasileiros tem alergia a estes ácaros. No Brasil, a prevalência de alergia a *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* é de 34 e 19,1%, respectivamente (BALDAÇARA et al., 2015).

2.3 Saúde humana e animal

Os ácaros de produtos armazenados podem desencadear reações alérgicas tais como asma, rinite alérgica, urticária e dermatite de contato através da inalação, ingestão ou contato com ácaros vivos ou mortos, subprodutos do metabolismo ou fezes (SINHA, 1979).

Casos de urticária e dermatite de contato são comuns em agricultores e trabalhadores de padarias e indústrias (REVSBECH; DUEHOLM, 1990; ARMENTISA et al., 1994; STORAAS et al., 2005; ESTÉVEZ, 2006; STEJSKAL; HUBERT, 2008). Além disso, a ingestão de alimentos preparados com farinhas infestadas por ácaros pode desencadear episódios de anafilaxia (ERBEN et al., 1993; POSTHUMUS;

BORISH, 2012; SANCHEZ-BORGES et al., 2013; TAKAHASHI et al., 2014; BARRERA et al., 2015). O primeiro caso de anafilaxia sistêmica ocorrida pela ingestão de alimentos infestados por ácaros foi relatado em 1993 tendo como agente causador *Dermatophagoides farinae* (ERBEN et al., 1993). Após este relato, muitos outros casos foram documentados, inclusive tendo como agente causador *Tyrophagus putrescentiae* (TAKAHASHI et al., 2014). Estima-se que a incidência de episódios de anafilaxia seja em torno de 0,5 a 2%, sendo a maioria pela ingestão de cereais (especialmente o trigo) contaminados por ácaros e seus alergênicos (POSTHUMUS; BORISH, 2012). Em geral, os episódios de anafilaxia ocorrem em pacientes com rinite alérgica ou asma, que sensibilizados para ácaros da poeira doméstica, desenvolvem reações alérgicas, mediadas ou não por IgE, após ingestão de farinha contaminada por ácaros de armazenamento (POSTHUMUS; BORISH, 2012). A sensibilização cruzada com ácaros da poeira doméstica já foi descrita na literatura (ARLIAN et al., 2009; LIAO et al., 2010;).

Em relação a animais, *Tyrophagus putrescentiae* é considerada a espécie mais abundante em ração de animais, alcançando o nível de praga, podendo estar associada com casos de dermatite atópica canina (HIBBERSON; VOGELNEST, 2014).

2.4 Macronutrientes

Proteína, lipídeos e carboidratos são macronutrientes essenciais para a alimentação humana. Todos os alimentos são constituídos por estes elementos, em maior quantidade, e por micronutrientes, vitamínicos e minerais, em menor quantidade. Os grãos e cereais são constituídos em sua grande parte por carboidratos, e constituem uma importante parcela da alimentação mundial (FLEURAT-LESSARD, 2017). Dietas saudáveis são constituídas por proporções equilibradas de macronutrientes, sendo que estas têm sido associadas a níveis mais baixos de marcadores inflamatórios e ao melhor controle de glicemia, além de reduzir o risco de dislipidemias e o desenvolvimento de doenças crônicas (MANGRAVITE et al., 2011).

2.5 Micronutrientes

Os minerais são elementos inorgânicos indispensáveis ao organismo, pois são responsáveis pela constituição dos ossos, dentes, músculos, sangue, células nervosas até a manutenção do controle hídrico. Geralmente se encontram quelados com constituintes orgânicos como enzimas, proteínas, hormônios, e principalmente, aminoácidos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008).

O cálcio é um macroelemento, e é o mineral mais abundante do organismo humano, sendo que 90% estão no esqueleto (ossos). O restante é distribuído em diversos tecidos, sobretudo no tecido muscular e plasma sanguíneo onde tem papel importante na permeabilidade celular, contração muscular, transmissão do fluxo nervoso e coagulação sanguínea. Deficiências graves de cálcio são raras, entretanto, a osteoporose atinge cerca de 2 a 8% dos adultos com mais de 50 anos (LOURES et al., 2017). No Brasil, a ingestão de cálcio está em torno de 300/500 mg por dia, quando as atuais recomendações são de cerca de 1.000 mg para a população adulta (COZZOLINO, 2007). O cobre é um antioxidante, cofator de inúmeras enzimas e importante na formação de tecidos conectivos e na produção de melanina (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008). A deficiência de cobre é rara, sendo que a recomendação diária é de 900 µg/dia para adultos (INSTITUTE OF MEDICINE, 2016). O ferro é indispensável no transporte de oxigênio através dos eritrócitos pela corrente sanguínea, sendo sua deficiência um dos principais fatores que levam à anemia, atingindo 46% das crianças e 48% das gestantes em âmbito mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Além da anemia ferropriva, o déficit de ferro ocasiona diminuição da imunidade, menor resistências às infecções, além da alteração nas estruturas epiteliais (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008). A recomendação atual de ferro é de 8 mg para homens e de 18 mg para mulheres em idade fértil (INSTITUTE OF MEDICINE, 2016).

O magnésio é um cátion extracelular muito importante, uma vez que participa da regulação de mais de 300 reações enzimáticas. Além disso, participa do processo

de duplicação dos ácidos nucleicos, excitabilidade neural e transmissão do influxo nervoso, agindo nas trocas iônicas de membrana celular (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008). A recomendação de ingestão é de 320 mg/dia para mulheres e 420 mg/dia para homens (INSTITUTE OF MEDICINE, 2016). A ingestão de magnésio fica abaixo, mas em algumas regiões mantém um nível limítrofe (COZZOLINO, 2007). O manganês tem um papel fundamental como cofator de enzimas que atuam na síntese do tecido conjuntivo e na regulação do metabolismo da glicose. A deficiência de manganês pode causar menor tolerância à glicose, além de outras alterações (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008). A ingestão recomendada é de 1,8 mg/dia para mulheres e 2,3 mg/dia para homens (INSTITUTE OF MEDICINE, 2016). O zinco também é um mineral importante, participando da ativação de cerca de 100 enzimas, além de fazer parte da estrutura de proteínas e membranas. Tem atividade importante na função reprodutiva e neurológica e no sistema imunológico (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2008). Resultados de pesquisas mostram que a carência de zinco pode estar relacionada com alterações no metabolismo de ácidos graxos e que em 48% das crianças obesas, a concentração de zinco no plasma é inferior ao padrão de referência de 75/110 µg/dia (COZZOLINO, 2007).

Sendo assim, especialmente devido à importância dos macronutrientes e micronutrientes para a saúde humana e da relação dos ácaros com alterações na quantidade destes nutrientes e da possibilidade de reações alérgicas cada vez mais prevalentes na população, estudos como este são importantes para nortear ações de saúde e nutrição no Brasil e em todo mundo.

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 Criação estoque de *Tyrophagus putrescentiae*

A criação estoque foi estabelecida a partir de espécimes de *Tyrophagus putrescentiae* coletadas em indústrias processadoras de grãos nas cidades de Estrela e Lajeado/RS. A criação estoque foi iniciada cerca de 28 dias antes do início do estudo

utilizando fermento biológico como substrato de manutenção das criações estoque no Laboratório de Acarologia do Centro Universitário Univates, Lajeado/RS.

3.2 Preparo das amostras

Foram adquiridos trinta quilos de trigo, trinta quilos de milho e trinta quilos de aveia em empresas que os utilizam como matéria-prima. O tipo de cultivar não foi definido no projeto, uma vez que o objetivo do trabalho é avaliar a infestação de ácaros em farinhas e não em um cultivar específico. No laboratório, as amostras foram moídas, homogeneizadas e acondicionadas em sacos plásticos que foram levados ao freezer a -18 °C por cerca de três dias para eliminar microrganismos ou artrópodes presentes na amostra (EATON; KELLS, 2011). As amostras foram retiradas do freezer e quarteadas para obtenção de aproximadamente 1000 g de cada um dos cereais que foram utilizadas para as análises de macronutrientes, micronutrientes e para a análise da presença de fungos no que foi denominado de “tempo zero”. Todas as análises de macronutrientes e micronutrientes foram realizadas em triplicata.

Em seguida, cada uma das amostras (trigo, milho e aveia) foi separada em vinte e sete porções com 1000 g e acondicionadas separadamente em recipiente plástico opaco com tampa que permite o fechamento e a troca gasosa. Os recipientes plásticos contendo as porções das amostras foram acondicionados em ambiente climatizado à 25 ± 1 °C e $80 \pm 5\%$ de umidade relativa do ar por 24 horas. Após este período dezoito dos vinte e sete recipientes plásticos de cada uma das amostras foram infestadas por *Tyrophagus putrescentiae* nos quais foram adicionadas 100 espécimes aparentemente sadios para cada quilo de farinha. Os recipientes foram fechados com tampa e plástico filme para evitar a saída dos ácaros. Eles foram acondicionados à 25 ± 1 °C e $80 \pm 5\%$ de umidade. Os outros nove recipientes de cada uma das amostras foram armazenados sob as mesmas condições de temperatura e umidade sem a introdução dos ácaros para servir como controle.

Nove porções foram analisadas ao completar três meses, nove porções ao completar seis meses e nove ao completar nove meses, sendo seis com ácaros e três sem ácaros em cada um dos períodos. Ao completar três e nove meses foram realizadas as análises de macronutrientes e micronutrientes enquanto que ao completar seis meses foram realizadas as análises de macronutrientes, micronutrientes e da presença de fungos conforme esquema mostrado na Tabela 1. Todas as análises de macronutrientes e micronutrientes foram realizadas em triplicata.

Tabela 1 – Esquema das análises

Análise	Tempo 0	Tempo 3	Tempo 6	Tempo 9
Umidade	*	*	*	*
Cinzas	*	*	*	*
Lipídeos	*	*	*	*
Proteína	*	*	*	*
Carboidrato	*	*	*	*
Cálcio	*	*	*	*
Cobre	*	*	*	*
Ferro	*	*	*	*
Magnésio	*	*	*	*
Manganês	*	*	*	*
Zinco	*	*	*	*

Fonte: elaborado pelo autor.

Antes das análises os ácaros foram retirados da amostra utilizando um funil de berlese equipado com lâmpadas de led conforme mostrado na figura 2, sendo que em cada compartimento do funil foram dispostos 50 g de farinha, por quatro dias. Como os ácaros não tem afinidade pela luz, os mesmos vão em direção do fundo do funil onde é disposto um copo com álcool. Ao cair no álcool os ácaros morrem, sendo possível sua quantificação. A definição de quatro dias no funil deu-se após testes prévios no laboratório. As três amostras sem a presença de ácaros também foram expostas ao funil de berlese para garantir que tivessem as mesmas condições ambientais. Uma porção de cerca de quinze gramas de cada uma das amostras foi triada com microscópio estetoscópio, sendo que esta porção das farinhas foram

utilizadas para as análises de umidade, uma vez que ao ficar disposta no ambiente a umidade poderia ser alterada.

Figura 2 – Funil de Berlese



Fonte: elaborado pelo autor.

Os ácaros foram quantificados em 100 g de farinha e o valor anotado. Em seguida, o número de ácaros foi extrapolado multiplicando o valor obtido por 10 vezes uma vez que tínhamos 1000 g de farinha em cada recipiente.

3.3 Análise de macronutrientes

As determinações de umidade, cinzas, lipídeo, proteína e carboidratos foram realizadas no Laboratório de Química do Centro Universitário Univates. Todas as análises serão feitas em triplicata conforme métodos descritos abaixo, sendo utilizado como resultado a média aritmética da triplicata.

3.3.1 Umidade

A técnica utilizada foi a 012/IV perda por dessecação (umidade) ou secagem direta em estufa a 105 °C. O princípio da técnica baseia-se na premissa que a umidade corresponde à perda em peso sofrida pelo produto quando aquecido em condições nas quais a água é removida.

Para a técnica de secagem direta em estufa a 105 °C foram pesadas cinco gramas de amostra em cadinho previamente tarado e calcinado. Os cadinhos foram levados a estufa por quatro horas no caso de amostras de trigo e milho e seis horas no caso de amostras de aveia. As amostras foram retiradas da estufa e resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente. Foram pesadas e esta operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até peso constante. A umidade (g/100g) foi calculada através da razão entre a perda de peso da amostra (em gramas) e a massa da amostra (em gramas) multiplicada por 100 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

3.3.2 Resíduo por incineração ou cinzas

A técnica utilizada foi a 018/IV resíduo por incineração – cinzas, na qual, cinzas ou resíduo por incineração é o nome dado ao resíduo obtido por aquecimento de um produto em temperatura próximo a 550-570 °C, com destruição da matéria orgânica, sem apreciável decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização.

Para esta técnica foram pesadas cinco gramas de amostra em um cadinho previamente tarado e calcinado. Os cadinhos foram levados a mufla a 550 °C por cerca de seis a oito horas, após a mufla foi desligada e os cadinhos foram resfriados até 150 °C. Em seguida, foi acrescentado 1 mL de HNO₃ 65% em cada uma das amostras e os cadinhos foram recolocados na mufla e a temperatura foi aumentada gradativamente para não projetar a amostra. Os cadinhos permaneceram na mufla por mais quatro a seis horas, quando a mesma foi desligada, os cadinhos foram resfriados até cerca de 180 °C e após foram resfriados em dessecador até a temperatura ambiente e pesados. Foram realizados vários testes até definir a

metodologia, uma vez que somente com a ácido foi possível obter cinzas brancas/acinzentadas. A quantidade de cinzas (g/100g) foi calculada através da razão entre as gramas de cinzas (em gramas) e a massa da amostra, em gramas, multiplicadas por 100 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

3.3.3 Lipídios

O método de extração de lipídeos baseia-se na extração com solventes a base de éter etílico seguida da remoção por evaporação ou destilação do solvente empregado. Para a técnica foi utilizado um extrator de lipídeos nos quais os tubos do extrator foram secos em estufa por duas horas, resfriados e pesados. Foram pesadas cinco gramas de amostra em cartucho de papel filtro dispostos em cestos próprios do extrator de lipídeos. O cartucho e os copos foram acoplados no aparelho extrator com cerca de 100 mL de solvente éter etílico. O extrator foi aquecido a temperatura de 70 °C. Após início da fervura as amostras ficaram submersas no éter por uma hora e trinta minutos; mais uma hora emerso em sistema de gotejamento e após este período o extrator foi fechado para recolher o éter. Após recolher o éter os tubos foram colocados na estufa, resfriados em dessecador e pesados até temperatura constante. A quantidade de lipídeos (g/100g) foi calculada multiplicando a quantidade de lipídeos (em gramas) por 100 e dividindo-se pela massa da amostra (em gramas) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

3.3.4 Proteínas

A técnica utilizada foi a 036/IV protídeos ou método de Kjeldahl clássico. O método de Kjeldhal fundamenta-se na digestão ácida do alimento em presença de catalisadores e por ação do calor com formação de amônia, posterior destilação desta e titulação com solução padrão.

Para a técnica foram pesadas duas gramas de amostra em papel filtro e transferidas para o balão de Kjeldahl (papel + amostra). Em seguida, foi adicionado quatro gramas de mistura catalítica e 20 mL de ácido sulfúrico. Os balões foram levados ao aquecimento em bloco digestor, na capela, até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido (pontos pretos). Foi adicionado 40 mL de água deionizada em cada amostra já resfriada. Em seguida, os balões foram acoplados ao conjunto de destilação, onde foi adicionado, por meio de um funil com torneira, solução de hidróxido de sódio a 50% até garantir um ligeiro excesso de base. O destilador foi aquecido à ebulição e cada amostra destilada até cerca de 150 mL em erlenmeyer contendo 40 mL de ácido bórico 40% e 5 gotas de indicador misto. O excesso de ácido sulfúrico foi titulado com solução de ácido clorídrico 0,1 N até viragem do indicador. A quantidade de proteína (g/100g) foi calculada através da razão da multiplicação de 100 por 0,0014 pelo volume de HCl 0,1 N gastos na titulação dividido pela massa da amostra (em gramas) multiplicado pelo fator de proteínas de (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Foi utilizado como fator de conversão proteína nitrogênio 5,7 para trigo, 5,83 para aveia (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008) e 5,72 para milho (SOSULSKI e IMAFIDON, 1990).

3.3.5 Carboidrato

A técnica utilizada foi a definida pela resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na qual carboidratos totais é igual a 100 menos a soma da umidade, proteína, lipídeos e cinzas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). O cálculo foi realizado utilizando as médias obtidas nas triplicatas de umidade, proteína, lipídeos e cinzas.

3.4 Análise de micronutrientes

Todas as análises de micronutrientes (minerais) foram realizadas no Laboratório de Química da Univates, no Laboratório do Centro Tecnológico da

Univates (Tecnovates) e no Laboratório de Metrologia Química da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) em triplicata. As determinações de ferro, cobre, zinco, manganês e magnésio foram realizadas através da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com chama (BOEN et al., 2007), enquanto que as análises de cálcio foram realizadas em Fotômetro de Chama.

3.4.1 Espectrometria de Absorção Atômica

As decomposições das amostras para leitura de ferro, zinco, manganês e magnésio foram realizadas em forno micro-ondas (Anton Paar PRO 60Hz Package 24HVT50). Nestes casos foram pesadas 0,3 g de amostra nos vasos do forno micro-ondas e adicionados seis mL de HNO₃ 65%. Os tubos foram deixados na capela por alguns minutos e após os mesmos foram fechados e colocados no rotor do forno micro-ondas. Para as amostras de trigo e milho foi utilizada curva de elevação até 80 °C por 10 minutos; curva estável a 80 °C por 10 minutos; curva de elevação até 100 °C por 10 minutos; curva estável a 100 °C por 10 minutos; curva de descida até 70 °C. Para as amostras de aveia foram utilizadas duas curvas adicionais, uma de elevação até 120 °C por 10 minutos; curva estável a 120 °C por 10 minutos e após a curva de descida até 70 °C como nas amostras anteriores, conforme mostrado na tabela 2. A programação utilizada foi previamente testada para que a amostra fosse completamente digerida.

Tabela 2 – Parâmetros analíticos para digestão de farinhas em forno micro-ondas

Parâmetros	Valor
Taxa de aumento de potência	0.5 bar/s
Pressão máxima	-
Potência máxima	1000 W
Limite de temperatura	-

Limite de temperatura interna		150 °C		
Trigo e milho	Rampas	Temperatura	Potência	Tempo
	1 Rampa subida	80 °C	-	10 min
	2 Rampa de suporte	80 °C	-	10 min
	3 Rampa subida	100 °C	-	10 min
	4 Rampa de suporte	100 °C	-	10 min
	5 Rampa de descida	70 °C	0	-
Aveia	Rampas	Temperatura	Potência	Tempo
	1 Rampa subida	80 °C	-	10 min
	2 Rampa de suporte	80 °C	-	10 min
	3 Rampa subida	100 °C	-	10 min
	4 Rampa de suporte	100 °C	-	10 min
	5 Rampa de subida	120 °C	-	10 min
	6 Rampa de suporte	120 °C	-	10 min
	7 Rampa de descida	70 °C	0	-

Fonte: elaborado pelo autor.

Após a decomposição o volume decomposto foi transferido para falcons de 20 mL e avolumado com água ultrapura 18.2 MΩ cm (Direct-Q UV, Millipore) para 10 mL

(no caso das amostras de milho para leitura do manganês) ou para falcons de 50 mL e avolumados com água ultrapura para 20 mL (para as demais leituras). Para leitura do magnésio as amostras foram diluídas na proporção de 1:1. A diluição foi realizada no laboratório e as amostras foram enviadas já diluídas para o laboratório do Tecnovates e UFPel. As determinações de zinco e magnésio foram realizadas no Tecnovates utilizando um espectrômetro de emissão atômica com chama (PerKin Elmer, PinAAcle 900T) e as determinações de ferro e manganês foram realizadas na UFPel em um Espectrômetro de Absorção Atômica com chama (PerKin Elmer, Analyst 200). Foram utilizadas lâmpadas de catodo oco de zinco, magnésio, ferro e manganês, operando nas condições fixadas pelo fabricante, com comprimento de onda de 213,86, 285,21, 248,33 e 279,50 nm e uma lâmpada de arco de deutério como corretor de fundo.

As decomposições das amostras para leitura de cobre e cálcio foram realizadas pesando cinco gramas de amostra em cadinhos previamente descontaminados com HNO_3 10% por 24 horas. Os cadinhos foram levados a mufla a 550 °C por cerca de seis a oito horas, após a mufla foi desligada e os cadinhos foram resfriados até 150 °C. Em seguida, foi acrescentado um mL de HNO_3 65% em cada uma das amostras e os cadinhos foram recolocados na mufla e a temperatura foi aumentada gradativamente para não projetar a amostra. Os cadinhos permaneceram na mufla por mais quatro a seis horas, quando a mesma foi desligada, os cadinhos foram resfriados até cerca de 180 °C e após foram resfriados em dessecador até a temperatura ambiente. Em seguida, os cadinhos foram lavados com uma solução de HCl e água ultrapura na proporção de 1:1. Cada cadinho foi lavado com 10 mL desta solução e as cinzas com a solução foram transferidas para béquer de 50 ml previamente descontaminados com HNO_3 10% por 24 horas. Os béqueres foram aquecidos em chapa de aquecimento a 100 °C até o volume ser reduzido pela metade. A solução foi filtrada em falcons de 20 mL com papel filtro e avolumada com água ultrapura para 10 mL. Esta solução foi utilizada para a leitura do cobre no Tecnovates em espectrômetro de emissão atômica com chama (PerKinElmer, PinAAcle 900T). Foram utilizadas lâmpadas de catodo oco de cobre, operando nas condições fixadas pelo fabricante, com comprimento de onda de 324,75 nm e uma lâmpada de arco de

deutério como corretor de fundo. Para a leitura do cálcio uma alíquota de 3 mL foi separada e foi adicionado 0,3 mL de solução de óxido de lantânio que é o supressor do cálcio. O cálcio foi lido no Laboratório de Química da Univates em fotômetro de chama marca Digimed modelo DM-62.

3.5 Análises estatísticas

Foram avaliadas as diferenças nas características físico-químicas do trigo, milho e aveia com e sem ácaros, no período de 0, 3, 6 e 9 meses de armazenamento por análise de variância. ANOVA seguido do Teste de Tukey foi utilizado para comparar variáveis com distribuição paramétrica e ANOVA de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Dunn para comparar variáveis com distribuição não-paramétrica. Foi utilizado o software BioEstat versão 5.3 e foi considerado significativo valores com $p < 0.05$ (Ayres et al., 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Artigo

Changes on the physicochemical characteristics during storage of cereals flour infested by mites

Patrícia Vogel, Lucélia Hoehne, Isadora Zanatta Esswein, Júlia Jantsch Ferla, Maria Cristina Dallazen, Taciélen Altmayer, Cassiano Ricardo Brandt, Meibel Teixeira Lisboa, Anderson Schwingel Ribeiro, Noeli Juarez Ferla

Abstract

Changes on the physicochemical characteristics of wheat, maize and oat flour infested by *Tyrophagus putrescentiae* (*T. putrescentiae*) were evaluated for a period of nine months of storage. The moisture increased, but there was no statistical difference.

The organic components, protein and lipids, decreased during storage, while ashes and minerals increased. We observed statistical differences during the period in the same samples. However, there was no statistical difference in samples with and without mites. Therefore, small amounts of *T. putrescentiae*, as assessed in the present study, were not able to change physicochemical characteristics in wheat, maize and oat flour.

Keywords

Cereals; storage; *Tyrophagus putrescentiae*; physicochemical characteristics

1. Introduction

Cereals constitute a vital part of the daily diet of the population worldwide. They are grown in a large number of countries and under different climate zones, both in small and in large scales and their production has steadily increased during the last several decades to meet the demand of our increasing world population. All over the world, huge amounts of grains are stored after harvest, oftentimes for over a year, in order to supply domestic cereal industries and satisfy import and export demand (Fleurat-Lessard, 2017).

Cereals are chiefly used by the industry to produce flour, noodles, biscuits, alcoholic beverages, biofuel, and several other products (Kamboj, Guha and Mishra, 2017). However, during storage, grains (wheat, maize, oats, rice, etc...) and derived products (meal and flour) are exposed to a great range of environmental variables that can change their quality, such as insects and mites infestation (Palyvos, Emmanouel and Saitanis, 2008; Keskin and Ozkaya, 2013).

Mites are very common pests of stored grain, particularly in temperate areas with high relative humidity, due to economic damages. In Brazil, *T. putrescentiae* is the most prevalent species (Franzolin and Baggio, 2000). They may trigger allergic

reactions such as asthma, allergic rhinitis, urticarial and contact dermatitis (Stejskal and Hubert, 2008). Furthermore, the ingestion of food prepared with meal and flour infested by mites may also trigger episodes of anaphylaxis (Barrera et al., 2015; Takahashi et al., 2014). It is not known if storage mites can alter the physicochemical characteristics of grains and products manufactured from them, therefore, the aim of this study was to evaluate the physicochemical characteristics of wheat, maize and oat flours when infested by *T. putrescentiae*, during zero, three, six and nine months of storage.

2. Materials and methods

2.1 Mites

T. putrescentiae was collected from a grain factory in Estrela, Rio Grande do Sul, Brazil. Culture lines have been established at the Acarology Laboratory at the University of Vale do Taquari UNIVATES, in Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil, and maintained for generations on dried yeast at $80 \pm 5\%$ relative humidity and 25 ± 1 °C.

2.2 Samples storage

Thirty kilograms of wheat grains were acquired at a mill, in Encantado, 30 kg of maize grains at a mill, in Dois Lajeados and 30 kg of oat grains at a factory, in Lagoa Vermelha, in Rio Grande do Sul, Brazil. In the laboratory, samples were ground, homogenized and stored in plastic bags that were kept in a freezer at -18 °C for about three days to eliminate microorganisms or arthropods that might have been present in the samples (Eaton and Kells, 2011).

They were taken from the freezer and then quartered to obtain approximately 1000 g of each cereal, which were used for analyses of macronutrients and micronutrients. These first analyses were denominated "time 0". All analyses of macronutrients and micronutrients were performed in triplicate. Each of the samples

(wheat, maize and oats) was subsequently sorted into 27 portions of 1000 g and individually stored in closed opaque plastic containers.

The containers were conditioned at $80 \pm 5\%$ relative humidity and $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h. After this period, eighteen of the 27 plastic containers of each cereal sample were infested by *T. putrescentiae*, to which 100 apparently healthy specimens from rearing stock were added to each container. The nine remaining containers from each cereal sample were stored under the same temperature and humidity conditions without introducing the mites, serving as control. Nine portions were analyzed at the completion of three months, nine portions at the end of six months and nine at the end of nine months, of which six were mite-infested and three were not. All analyses of macronutrients and micronutrients were performed in triplicate.

Prior to the analyses, the mites were extracted using a Berlese funnel equipped with LED lamps, a collecting vessel with 70% alcohol at the bottom, and 50 g of flour were placed in each funnel compartment where it remained for four days. The mites removed during the process were counted under a microscope. The three samples without the presence of mites were also exposed to the Berlese funnel to ensure that they had the same environmental conditions. A portion of about 15 g of each sample was manually screened under a stereo microscope, and used for moisture analysis, since the moisture content could be altered if the samples were left exposed in the Berlese funnel for four days.

2.3 Analyses of macronutrients

For the analyses of macronutrients, the following techniques were employed: to measure moisture, 012/IV loss by desiccation (moisture) or direct drying in an oven at 105°C ; for ash analysis, 018/IV waste by incineration; to measure lipids, the technique used was based on solvent extraction with ethyl ether followed by removal by evaporation or distillation of the solvent employed; and, for protein, the 036/IV protein or classical Kjeldahl method (Instituto Adolfo Lutz, 2008). As nitrogen to protein

conversion factor, we used 5.7 for wheat, 5.83 for oats (Instituto Adolfo Lutz, 2008) and 5.72 for maize (Sosulski and Imafidon, 1990). To calculate the amount of carbohydrates, the technique employed was defined by resolution RDC number 360, from 23 December 2003 of the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA) in which the total amount of carbohydrates is equal to 100 minus the sum of moisture, protein, lipids and ashes (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003).

2.4 Analyses of micronutrients

The digestion of the samples for quantification of iron, zinc, manganese and magnesium was carried out using an Anton Paar® microwave oven (model PRO 60 Hz Package 24HVT50). A portion of 0.3 g of each sample was weighed accurately into oven's vessel and 6.0 mL of HNO₃ 65% were added. The vessels were then sealed and placed into the rotor for digestion. The microwave heating programs are given in Table 1.

Table 1: Analytical parameters for flour sample digestion

Parameter	Value
Max power increase rate	0.5 bar/s
Max pressure	-
Max microwave power	1000 W
IR temp limit	-
Internal temp limit	150 °C

Wheat and maize	Steps	Temperature	Power	Time
	1 Power ramp	80 °C	-	10 min
	2 Power hold	80 °C	-	10 min
	3 Power ramp	100 °C	-	10 min
	4 Power hold	100 °C	-	10 min
	5 Cooling	70 °C	0	-
Oats	Steps	Temperature	Power	Time
	1 Power ramp	80 °C	-	10 min
	2 Power hold	80 °C	-	10 min
	3 Power ramp	100 °C	-	10 min
	4 Power hold	100 °C	-	10 min
	5 Power ramp	120 °C	-	10 min
	6 Power hold	120 °C	-	10 min
	7 Cooling	70 °C	0	-

Prior to the actual analyses, the programming settings were tested to ensure that the samples would be fully digested. After digestion process, samples were transferred into 20 mL volumetric flasks and diluted with ultrapure water 18.2 MΩ cm

(Direct-Q UV, Millipore) to 10 mL (only samples of maize to determine the amount of manganese) or 50 mL volumetric flasks and diluted with ultrapure water to 20 mL (for all other quantifications). To determine the amount of magnesium, the samples were diluted in the ratio of 2.0 mL of sample to 2.0 mL of ultrapure water using a micropipette. The quantifications were taken using a flame atomic absorption spectrometer (Annalyst 200, Perkin Elmer for quantification of iron and manganese, and PinAAcle 900T, PerKin Elmer for quantification of magnesium and zinc), using as accessory an automatic SIPS diluter system equipped with a deuterium lamp as background correction and hollow cathode lamps, operating in conditions determined by fabricant, with wavelengths of 248.33, 279.50, 285.21, 213.86 nm for iron, manganese, magnesium and zinc, respectively.

The digestion of the samples for quantification of copper and calcium was performed weighing accurately 5.0 g of sample in crucibles previously decontaminated with HNO_3 10% for 24 hours. The crucibles were brought to muffle furnace at 550 °C for six to eight hours. It was later turned off and the crucibles were cooled to 150 °C. Thereafter, 1.0 mL of HNO_3 65% was added to each of the samples and the crucibles were returned to the muffle furnace and the temperature was gradually increased not to project the sample. The crucibles remained in the muffle furnace between one and two hours. When the muffle furnace was switched off, the crucibles were cooled to about 180 °C and then transferred to a desiccator where they remained at room temperature. The crucibles were then washed with HCl 37% and ultrapure water in the ratio of 1:1. Each crucible was washed with 10 mL of this solution and the ashes with the solution were transferred to a 50 mL beaker previously decontaminated with HNO_3 10% for 24 h. The beakers were heated in a heating plate at 100 °C until volume was reduced by half. After digestion process, the samples were filtered through qualitative filter paper into 20 mL volumetric flasks and diluted with ultrapure water to 10 mL. This solution was used for quantification of copper by using a flame atomic absorption spectrometer (PinAAcle 900T, PerKinElmer), using as accessory an automatic SIPS diluter system equipped with a deuterium lamp as background correction and hollow cathode lamps, operating in conditions determined by fabricant, with wavelengths of 324.75 nm. For calcium determination, 3.0 mL were separated and 0.3 mL of

lanthanum oxide solution, a calcium suppressant, was added using a micropipette. Calcium was determined by using a flame photometer (Digimed, DM-62).

2.5 Statistical analysis

Differences in physicochemical properties of wheat, maize and oat flours with and without mites, among zero, three, six and nine months of storage were evaluated through analysis of variance. One-way ANOVA and later the Tukey test were used to compare the variables with parametric data, and ANOVA the Kruskal-Wallis and later the Dunn Test were used to compare the variables with non-parametric data. BioEstat software version 5.3 (Ayres et al., 2007) was used and all measures of significance were evaluated for $p < 0.05$.

3. Results

Overall, the moisture increased, but there was no statistical difference in the samples. The organic components, protein and lipids, decreased during storage, while ashes and minerals increased. We did not observed statistical differences in samples with and without mites, that is, the mites did not influence the physicochemical characteristics of wheat, maize and oats flours. In the amount of mites, the highest average was observed in wheat and maize flour at three months (38.33 mites). At nine months, no live mite was found in the samples of flours studied.

In wheat flour, moisture increased during storage, but there was not a significant difference (Table 2). The amount of lipids increased after three and six months of storage, and nine months later, it had not changed. The amount of protein did not change significantly in the analysed period. The amount of ashes decreased between time zero and three months and remained the same at nine months. In all analyses, there was no statistical difference between the samples with and without mites. Calcium, copper, manganese and magnesium increased during storage while zinc

decreased. Mean of live mites removed from wheat flour after three, six and nine months was 38.33, 11.66 and 0, respectively. In maize flour, the moisture increased, but there was no statistical difference (Table 3). Overall, the quantity of lipids decreased, especially after six months of storage, although not in all samples. For this reason, we believe that the results may have been influenced by factors not studied. The amount of protein and carbohydrate did not change during storage. The overall amount of ashes increased significantly during storage in samples with mites. Calcium increased significantly. Copper, iron, manganese and zinc, nevertheless, did not change, while magnesium decreased. With the exception of ashes, there was no statistical difference between maize samples with and without mites. Mean of live mites removed from maize flour after three, six and nine months was 38.33, 6.66 and 0, respectively. Lastly, in oat flour, moisture, protein and ashes remained the same in the analysed period (Table 4). The amount of lipids decreased during storage, but there was no statistical difference between the samples with and without mites. Regarding micronutrients, the total amount of ashes remained the same, although some variation in the amount of magnesium and manganese was observed. After nine months, there was a significant difference in the amount of copper and magnesium in samples with and without mites. Mean of live mites removed from oats flour after three, six and nine months was 25.00, 3.33 and 0, respectively.

Table 2: Analyses of macronutrients and micronutrients in wheat flour kept stored at $80 \pm 5\%$ relative humidity and 25 ± 1 °C.

Analyses	*	Time (in months)				Test	p
		0	3	6	9		
Moisture (g/100g)	0	11.92 \pm 0.02 b	12.50 \pm 0.12 ab	12.59 \pm 0.07 a	12.33 \pm 0.04 ab	H=19.29	p=0.003
	1		12.41 \pm 0.21 ab	12.51 \pm 0.06 ab	12.22 \pm 0.09 ab		
Protein (g/100g)	0	9.56 \pm 0.10 ab	10.27 \pm 0.14 a	9.71 \pm 0.49 ab	9.39 \pm 0.27 b	F=5.04	p=0.002
	1		9.97 \pm 0.29 ab	9.56 \pm 0.08 b	9.53 \pm 0.22 b		
Lipids (g/100g)	0	0.92 \pm 0.08 d	1.38 \pm 0.06 ab	1.32 \pm 0.12 ab	1.07 \pm 0.03 cd	F=30.39	p<0.0001
	1		1.24 \pm 0.05 b	1.42 \pm 0.07 a	1.10 \pm 0.29 c		
Carbohydrate (g/100g)	0	76.04 \pm 0.21 a	74.37 \pm 0.20 c	74.87 \pm 0.62 bc	75.67 \pm 0.28 ab	F=12.57	p<0.0001
	1		74.93 \pm 0.39 bc	74.97 \pm 0.13 bc	75.58 \pm 0.21 a		
Ashes (g/100g)	0	1.54 \pm 0.02 a	1.47 \pm 0.005 b	1.47 \pm 0.05 b	1.52 \pm 0.01 ab	F=5.71	p=0.001
	1		1.46 \pm 0.03 b	1.50 \pm 0.01 b	1.53 \pm 0.02 a		
Calcium (mg/g)	0	0.025 \pm 0.0005 b	0.022 \pm 0.0005 c	0.016 \pm 0.0006 d	0.031 \pm 0.00008 a	F=501.70	p<0.0001
	1		0.022 \pm 0.0004 c	0.017 \pm 0.0008 d	0.031 \pm 0.0003 a		
Copper (mg/g)	0	0.0030 \pm 0.00003 b	0.0042 \pm 0.0001 ab	0.0036 \pm 0.00009 ab	0.0050 \pm 0.0003 a	H=23.73	p=0.0006
	1		0.0041 \pm 0.0002 ab	0.0038 \pm 0.0003 ab	0.0049 \pm 0.0008 a		
Iron (mg/g)	0	0.033 \pm 0.001 b	0.041 \pm 0.0008 a	0.032 \pm 0.001 b	0.031 \pm 0.0001 b	F=44.55	p<0.0001
	1		0.042 \pm 0.001 a	0.033 \pm 0.0008 b	0.035 \pm 0.001 b		
Magnesium (mg/g)	0	0.93 \pm 0.06 c	1.32 \pm 0.18 a	0.98 \pm 0.10 bc	1.27 \pm 0.04 a	F=6.40	p=0.0007
	1		1.18 \pm 0.14 ab	1.24 \pm 0.06 a	1.22 \pm 0.07 ab		
Manganese (mg/g)	0	0.034 \pm 0.004 b	0.041 \pm 0.0007 a	0.037 \pm 0.0001 a	0.040 \pm 0.0004 a	H=20.16	p=0.002
	1		0.038 \pm 0.002 a	0.037 \pm 0.0007 a	0.041 \pm 0.0008 a		
Zinc (mg/g)	0	0.026 \pm 0.002 a	0.021 \pm 0.005 ab	0.026 \pm 0.001 a	0.020 \pm 0.0003 b	F=5.60	p=0.001
	1		0.024 \pm 0.001 ab	0.025 \pm 0.001 a	0.020 \pm 0.001 b		

* 0: without mites; 1: with mites. The same letters show there was no statistical difference in the samples. The measures were considered significant when $p < 0.05$ by ANOVA the Kruskal-Wallis and later Dunn Test and Tukey Test.

Table 3: Analyses of macronutrients and micronutrients in maize flour kept stored at $80 \pm 5\%$ relative humidity and 25 ± 1 °C.

Analyses	*	Time (in months)				Test	p
		0	3	6	9		
Moisture (g/100g)	0	14.17 \pm 0.03 ab	15.66 \pm 1.25 ab	16.81 \pm 1.42 ab	13.76 \pm 0.06 b	H=19.67	p=0.003
	1		14.30 \pm 0.91 ab	16.74 \pm 1.07 ab	18.49 \pm 3.44 a		
Protein (g/100g)	0	6.58 \pm 0.04 ab	7.55 \pm 0.13 a	6.86 \pm 0.14 a	6.64 \pm 0.33 a	H=18.93	p=0.004
	1		7.54 \pm 0.18 a	7.28 \pm 0.14 a	7.31 \pm 0.46 a		
Lipids (g/100g)	0	2.52 \pm 0.08 ab	2.13 \pm 1.37 ab	1.04 \pm 1.36 ab	2.48 \pm 0.09 ab	F=3.63	p=0.01
	1		2.55 \pm 1.02 a	0.82 \pm 0.95 b	0.92 \pm 0.96 b		
Carbohydrate (g/100g)	0	75.63 \pm 0.12 a	73.44 \pm 2.10 a	74.06 \pm 0.45 a	75.90 \pm 0.19 a	H=10.75	p=0.09
	1		74.37 \pm 0.51 a	73.90 \pm 0.84 a	71.97 \pm 3.79 a		
Ashes (g/100g)	0	1.08 \pm 0.04 b	1.19 \pm 0.03 ab	1.20 \pm 0.004 ab	1.19 \pm 0.03 ab	H=18.08	p=0.006
	1		1.22 \pm 0.01 ab	1.24 \pm 0.02 a	1.28 \pm 0.06 a		
Calcium (mg/g)	0	0.019 \pm 0.0002 b	0.017 \pm 0.0003 b	0.018 \pm 0.0007 b	0.024 \pm 0.001 a	F=85.44	p<0.0001
	1		0.017 \pm 0.0005 b	0.018 \pm 0.0007 b	0.026 \pm 0.001 a		
Copper (mg/g)	0	0.0017 \pm 0.00006 a	0.0025 \pm 0.0006 a	0.0022 \pm 0.0002 a	0.0033 \pm 0.0001 a	F=18.21	p<0.0001
	1		0.0025 \pm 0.00009 a	0.0023 \pm 0.0002 a	0.0035 \pm 0.0003 a		
Iron (mg/g)	0	0.021 \pm 0.007 a	0.043 \pm 0.001 a	0.030 \pm 0.019 a	0.019 \pm 0.004 a	H=15.73	p=0.01
	1		0.042 \pm 0.007 a	0.035 \pm 0.002 a	0.038 \pm 0.007 a		
Magnesium (mg/g)	0	0.91 \pm 0.07 ab	1.27 \pm 0.07 ab	1.13 \pm 0.03 ab	0.56 \pm 0.004 b	H=25.21	p=0.0003
	1		1.17 \pm 0.09 a	0.99 \pm 0.09 ab	0.56 \pm 0.033 b		
Manganese (mg/g)	0	0.0042 \pm 0.00 ab	0.0051 \pm 0.0001 ab	0.0053 \pm 0.0001 ab	0.0049 \pm 0.0004 a	H=21.13	p=0.001
	1		0.0040 \pm 0.0001 b	0.0062 \pm 0.0004 a	0.0043 \pm 0.0004 b		
Zinc (mg/g)	0	0.0076 \pm 0.004 a	0.0079 \pm 0.0007 a	0.0071 \pm 0.0008 a	0.0074 \pm 0.001 a	H=9.74	p=0.13
	1		0.0066 \pm 0.001 a	0.0082 \pm 0.0005 a	0.0084 \pm 0.0005 a		

* 0: without mites; 1: with mites. The same letters show there was no statistical difference in the samples. The measures were considered significant when $p < 0.05$ by ANOVA the Kruskal-Wallis and later Dunn Test and Tukey Test.

Table 4: Analyses of macronutrients and micronutrients in oats flour kept stored at $80 \pm 5\%$ relative humidity and $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Analyses	*	Time (in months)				Test	p
		0	3	6	9		
Moisture (g/100g)	0	11.41 \pm 0.02 a	11.04 \pm 0.02 ab	11.31 \pm 0.10 ab	10.04 \pm 0.02 b	H=22.14	p=0.001
	1		11.02 \pm 0.12 ab	11.27 \pm 0.07 ab	11.06 \pm 0.18 ab		
Protein (g/100g)	0	13.57 \pm 0.10 a	13.48 \pm 0.55 a	13.42 \pm 0.45 a	13.31 \pm 0.46 a	H=8.19	p=0.22
	1		13.74 \pm 0.40 a	13.16 \pm 0.40 a	13.59 \pm 0.07 a		
Lipids (g/100g)	0	8.08 \pm 0.20 a	6.75 \pm 0.23 b	6.53 \pm 0.31 b	5.50 \pm 0.30 c	F=48.88	p<0.0001
	1		6.65 \pm 0.11 b	6.34 \pm 0.30 b	5.49 \pm 0.20 c		
Carbohydrate (g/100g)	0	64.90 \pm 0.08 b	66.68 \pm 0.51 ab	66.73 \pm 0.78 ab	69.77 \pm 1.77 a	H=22.32	p=0.001
	1		66.54 \pm 0.34 ab	67.22 \pm 0.65 ab	67.87 \pm 0.33 a		
Ashes (g/100g)	0	2.01 \pm 0.004 a	2.02 \pm 0.01 a	1.98 \pm 0.06 a	2.03 \pm 0.002 a	H=13.69	p=0.03
	1		2.03 \pm 0.02 a	1.99 \pm 0.01 a	1.97 \pm 0.05 a		
Calcium (mg/g)	0	0.031 \pm 0.0003 a	0.025 \pm 0.0005 b	0.024 \pm 0.0006 b	0.032 \pm 0.0006 a	F=148.36	p<0.0001
	1		0.025 \pm 0.0003 b	0.024 \pm 0.0006 b	0.032 \pm 0.0008 a		
Copper (mg/g)	0	0.0043 \pm 0.0001 b	0.0050 \pm 0.0003 ab	0.0042 \pm 0.0002 ab	0.0058 \pm 0.0004 ab	H=24.85	p=0.0004
	1		0.0051 \pm 0.00008 ab	0.0042 \pm 0.0002 ab	0.0063 \pm 0.0003 b		
Iron (mg/g)	0	0.04 \pm 0.001 ab	0.05 \pm 0.007 a	0.05 \pm 0.001 ab	0.04 \pm 0.001 b	H=24.46	p=0.0004
	1		0.05 \pm 0.002 a	0.04 \pm 0.001 ab	0.04 \pm 0.001 b		
Magnesium (mg/g)	0	1.25 \pm 0.19 b	1.42 \pm 0.02 ab	1.19 \pm 0.04 b	1.55 \pm 0.08 ab	F=8.55	p=0.0002
	1		1.45 \pm 0.09 ab	1.19 \pm 0.09 b	1.56 \pm 0.14 a		
Manganese (mg/g)	0	0.054 \pm 0.003 b	0.065 \pm 0.009 ab	0.057 \pm 0.0004 ab	0.065 \pm 0.001 a	H=23.80	p=0.0006
	1		0.060 \pm 0.001 ab	0.055 \pm 0.001 b	0.064 \pm 0.002 a		
Zinc (mg/g)	0	0.035 \pm 0.001 ab	0.040 \pm 0.004 ab	0.042 \pm 0.0003 a	0.033 \pm 0.001 ab	H=19.88	p=0.002
	1		0.034 \pm 0.004 ab	0.042 \pm 0.001 a	0.033 \pm 0.001 b		

* 0: without mites; 1: with mites. The same letters show there was no statistical difference in the samples. The measures were considered significant when $p < 0.05$ by ANOVA the Kruskal-Wallis and later Dunn Test and Tukey Test.

4. Discussion

We did not find any specific recent studies on changes in physicochemical characteristics of flour infested with mites in scientific literature. Overall, we did not observed significant changes in macronutrients in the samples of wheat, maize and oats flour with and without mites. These observations were consistent with the previous findings, for example, the study by Keskin and Ozkaya (2015) and Kamboj, Guha and Mishra (2017) which did not show significant changes in macronutrients in wheat grains. Other work has shown changes due to storage (Tembo, Holmes and Marshall, 2017). In samples with changes, in the vast majority of cases, the alterations occurred in flour with and without mites, suggesting that storage time could be more influent over the amount of macronutrients and micronutrients. However, Solomon (1946) reported a reduction in the rate of seed germination, and Krantz (1955) indicated a reduction in the nutritional quality of grains infested by mites.

Moisture, overall, increased in the samples of flour, but there was no statistical difference. The increase in moisture can be associated with the hygroscopic character of flour and its consequent tendency to respond to changes in ambient relative humidity, as well as the transfer properties of water vapor of the packaging material (Ito et al., 2017). The organic components of flour, especially protein and lipids, decreased in the samples. The amount of lipids decreased significantly in maize flour, and in oat flour, lipids and proteins decreased significantly. The quantity of protein and lipids in wheat flour remained the same. Even though such reduction was expected, we cannot attribute it to mites, since it was observed in both samples with and without mites. A study with apple pomace flour, presented similar data, significant increase of moisture and reduction of organic components such as proteins and lipids during storage (Ito et al., 2017). Minerals, overall, increased or remained stable during storage, with the exception of magnesium in maize flour and zinc in wheat flour. A similar study measured the amount of minerals and vitamins of the wheat infested by the insect *Sitophilus granarius* L. In this study, the amounts of calcium, copper, iron, magnesium, manganese and zinc increased significantly in samples of two varieties of wheat infested with *S. granarius*. Although they are not the same group, insects and mites belong to the phylum Arthropoda, and can be compared (Keskin and Ozkaya, 2013). Another study shows that mites can change properties of lipids, but it was

unclear in this study whether mites themselves or symbiotic microorganisms were responsible for inserting a double bond into the D12 position of 9-octadecenoic acid (Aboshi et al., 2013). Overall, the organic components decreased in wheat, maize and oat flour, while the minerals increased during the storage. A hypothesis is that during the storage of flour, degradation of organic compounds occurred, especially proteins and lipids, which are associated with minerals as copper, iron, manganese and zinc. When the chemical bond between metals and proteins were possibly broken, increasing the availability of the metals for measurements (Bittencourt et al., 2014). We cannot state that the mites promoted the physicochemical alterations observed in the present study; there is, however, an indication that they may cause changes according to the results of the studies cited above.

A possible explanation for this is the amount of mites placed in the flours, which, needless to say, cannot be extrapolated to large infestations of mites. Our objective was to establish a major infestation, but due to some environmental conditions, this did not occur. We believe that it has to do with the moisture of the flour that was 12.37% in wheat samples, 15.95% in maize samples and 11.05% in the oat samples, and technical recommendations indicate that moisture of grain favourable to the development of the majority of pests is from 12 to 15% (Gallo et al., 2002). According to this same technical recommendation, fungal attack is an important problem with moisture over 15% (Gallo et al., 2002) however; fungi can be favourable to mite population's growth (Hubert et al., 2004; Nesvorná, Gabrielova and Hubert, 2012). In this study, only samples of wheat presented moisture between 12 and 15% indicating that the moisture may not have contributed to the infestation the mites, and in maize, where moisture was over 15%, it is possible that we had fungal attack. In maize flour, we observed colour changes during storage in some samples. In a general way, colour changes in a stored food product occur due to oxidation reactions involving carotenoids, lipids, and enzymes (Vitali and Quast, 2004). In this study, we observed a decreased of the amount the lipids and color changes of the samples. It is probable that fungi are the main responsible for the degradation of lipids, since it occurred in the samples with and without mites, and the fungi act as primary degraders of organic components (Fabian et al., 2017). We did not take fungi into account, which is a limitation of the present study. An important point is the possibility of some

experimental error in the analyses, because they have been performed over a long period. However, all analyses were performed repeatedly and the vast majority of the results showed small standard deviation between the same samples.

In conclusion, the mites did not significantly alter the physicochemical characteristics of the wheat, maize and oats flours, and the changes can be attributed to the storage time of these cereals. The organic components decreased in wheat, maize and oat flour, while the minerals increased during the storage. A hypothesis is that during the storage of flour, degradation of organic compounds occurred, especially proteins and lipids, which are associated with minerals as copper, iron, manganese and zinc. Still, more studies are required to confirm these results and to evaluate the effects of large amounts of mites in flour.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support provided by CAPES (Brazilian Research Supporting Foundation).

References

- Aboshi, T., Shimizu, N., Nakajima, Y., Honda, Y., Kuwahara, Y., Amanoc, H., Mori, N., 2013. Biosynthesis of linoleic acid in *Tyrophagus mites* (Acarina: Acaridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43, 991-996. DOI: 10.1016/j.ibmb.2013.08.002.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2003. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003.
- Ayres, M., Ayres, Jr. M., Ayres, D.L., Santos, A.A., 2007. Bioestat – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua, Belém.

Barrera, O.M., Murgas I.L., Bermúdez, S., Miranda R.J., 2015. Anafilaxia oral por ingestión de alimentos contaminados con ácaros en Ciudad de Panamá, 2011-2014. *Revista Alergia México*, 62, 2, 112-117.

Collins, D.A., 2012. A review on the factors affecting mite growth in stored grain commodities. *Experimental and Applied Acarology*, 56, 191-208. DOI: 10.1007/s10493-012-9512-6.

Eaton, M., Kells, S.A., 2011. Freeze Mortality Characteristics of the Mold Mite *Tyrophagus putrescentiae*, a Significant Pest of Stored Products. *Journal of Economic Entomology*, 104, 4, 1423-1429.

Fleurat-Lessard, F., 2017. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins - An update. *Journal of Stored Products Research*, 71, 22-40. DOI: doi.org/10.1016/j.jspr.2016.10.002.

Franzolin, M. R., Baggio, D., 2000. Contaminação por ácaros em arroz polido e feijão comercializados a granel. *Revista da Saúde Pública*, 34, 1, 77-83.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C., 2002. *Entomologia agrícola*. 1. ed. São Paulo: Fundação de estudos agrários Luiz de Queiroz - FEALQ.

Instituto Adolfo Lutz, 2008. *Métodos físicos-químicos para análise de alimentos*. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

Ito, V.C., Zielinski, A.A.F., Avila, S., Spoto, M., Nogueira, A., Schnitzler, E., Lacerda, L.G., 2017. Effects of gamma radiation on physicochemical, thermogravimetric, microstructural and microbiological properties during storage of apple pomace flour. *LWT - Food Science and Technology*, 78, 105-113. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.016.

Kamboj, U., Guha, P., Mishra, S., 2017. Changes in rheological properties of wheat due to storage. *Journal of the science of food and agriculture*. DOI: 10.1002/jsfa.8603.

Keskin, S., Ozkaya, H., 2015. Effect of storage and insect infestation on the technological properties of wheat. *CyTA – Journal of Food*, 13, 134-139. DOI: dx.doi.org/10.1080/19476337.2014.919962.

Keskin, S., Ozkaya, H., 2013. Effect of Storage and Insect Infestation on the Mineral and Vitamin Contents of Wheat Grain and Flour. *Journal of Economic Entomology*, 106, 2, 1058-1063. DOI: 10.1080/19476337.2014.919962.

Krantz, G.W., 1955. Some mites injurious to farm-stored grain. *Journal of Economic Entomology*, 48, 754-755.

Palyvos, N.E., Emmanouel, N.G., Saitanis, C.J., 2008. Mites associated with stored products in Greece. *Experimental and Applied Acarology*, 44, 3, 213-226. DOI: 10.1007/s10493-008-9145-y.

Solomon, M.E., 1946. Tyroglyphid mites in stored products; nature and amount of damage to wheat. *The annals of Applied Biology*, 280-289.

Sosulski, F. W., Imafidon, G. I., 1990. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 6, 1351-1356.

Stejskal, V., Hubert, J., 2008. Risk of occupational allergy to stored grain arthropods and false pest-risk perception in Czech grain stores. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 15, 1, 29-35.

Takahashi, K., Taniguchi, M., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Watai, K., Mitsui, C., Tanimoto, H., Oshikata, C., Tsuburai, T., Tsurikisawa, N., Minoguchi, K., Nakajima, H., Akiyama, K., 2014. Oral mite anaphylaxis caused by mite-contaminated okonomiyaki/ pancake-mix in Japan: 8 case reports and a review of 28 reported cases. *Allergology international: official journal of the Japanese Society of Allergology*, 63, 1, 51-56. DOI: 10.2332/allergolint.13-OA-0575.

Tembo, D. T., Holmes, M. J., Marshall, L. J., 2017. Effect of thermal treatment and storage on bioactive compounds, organic acids and antioxidant activity of baobab fruit (*Adansonia digitata*) pulp from Malawi. *Journal of Food Composition and Analysis*. DOI: [dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.002](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.002).

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção 1, p. 33.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 fev. 2011. Seção 1, p. 72.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 14, de 28 de março de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 31 mar. 2014. Seção 1, p. 58.

ARLIAN, L. G. et al. Cross-reactivity between storage and dust mites and between mites and shrimp. **Experimental and Applied Acarology**, v. 47, p. 159-172, 2009.

ARMENTISA, L. G. et al. Allergenic characterization of *Tyrophagus putrescentiae* using sera from occupationally exposed farmers. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 22, p. 152-154, 1994.

ASPALY, G. et al. Temperature-dependent population growth of three species of stored product mites (Acari: Acaridida). **Experimental and Applied Acarology**, v. 42, p. 37-46, 2007.

ATUÍ, M. B.; LÁZZARI, F. A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 363-367, 1998.

AYGUN, O.; YAMAN, M.; DURMAZ, H. A survey on occurrence of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae) in Surk, a traditional Turkish dairy product. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 878-881, 2007.

- BAGGIO, D. et al. Avaliação da presença de ácaros em cereais armazenados na Grande São Paulo. **An Esc Super Agric Luiz de Queiroz Univ São Paulo**, v. 44, n. 1, p. 617-626, 1987.
- BALDAÇARA, R. P. C. et al. Prevalence of allergen sensitization, most important allergens and factors associated with atopy in children. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 131, n. 5, p. 301-308, 2015.
- BARRERA, O. M. et al. Oral anaphylaxis by ingestion of mite contaminated food in Panama City, 2011-2014. **Sociedad Mexicana de Alergia e Inmunología**, v. 62, n. 2, p. 112-117, 2015.
- BOEN, T. R. et al. Avaliação do teor de ferro e zinco e composição centesimal de farinhas de trigo e milho enriquecidas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 589-596, 2007.
- BRAZIS, P. et al. Evaluation of storage mite contamination of commercial dry dog food. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 209-214, 2008.
- CHMIELEWSKI, W. Acceptance of buckwheat grain as a food by *Tyrophagus putrescentiae* (Schr.) (Acari: Acaridae). **Fagopyrum**, v. 16, p. 95-97, 1999.
- COLLINS, D. A. A review on the factors affecting mite growth in stored grain commodities. **Experimental and Applied Acarology**, v. 56, p. 191-208, 2012.
- COZZOLINO, S. M. F. Deficiências de minerais. **Estudos avançados**, v. 21, n. 60, p. 119-126, 2007.
- da SILVA, G.L. et al. Comparison of biological development of (Blattisocidae) fed on (Acaridae) and (Analgidae). **International Journal of Acarology**, v. 42, p. 1-7, 2016.
- DEBJANI, B.; SALIL, K. G.; NIRMAL, D. First report of some stored product mites from the Sultanate of Oman. **Iranian Journal of Entomology**, v. 3, p. 6-7, 2013.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. Dossiê: Os minerais na alimentação. **Revista Fi**, n. 4, p. 48-65, 2008.
- DUEK, L. et al. Mites in fungal cultures. **Mycoses**, v. 44, p. 390-394, 2001.

EATON, M.; KELLS, S. A. Freeze Mortality Characteristics of the Mold Mite *Tyrophagus putrescentiae*, a Significant Pest of Stored Products. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 4, p. 1423-1429, 2011.

ERBAN, T.; RYBANSKA, D.; HUBERT, J. Population Growth of the Generalist Mite *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridida) Following Adaptation to High- or Low-Fat and High- or Low-Protein Diets and the Effect of Dietary Switch. **Environmental Entomology**, p. 1-6, 2015.

ERBEN, A. M. et al. Anaphylaxis after ingestion of beignets contaminated with *Dermatophagoides farinae*. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 92, n. 6, p. 846-849, 1993.

ESTÉVEZ, M. D. Occupational contact urticaria-dermatitis by *Tyrophagus putrescentiae*. **Contact Dermatitis**, v. 55, n. 5, p. 308-309, 2006.

FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de importância médico-veterinária**. 3. ed. São Paulo: Nobel, 1985.

FLECHTMANN, C. H. W. Ácaros em produtos armazenados e na poeira domiciliar. **E.S.A. "L.Q."**, Piracicaba, 1986.

FLEURAT-LESSARD, F. Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins - An update. **Journal of Stored Products Research**, v. 71, p. 22-40, 2017.

FRANZOLIN, M. R. et al. Interaction between toxigenic *Aspergillus flavus* Link and mites (*Tyrophagus putrescentiae* Schrank) on maize grains: effects on fungal growth and aflatoxin production. **Journal of Stored Products Research**, v. 35, n. 3, p. 215-224, 1999.

FRANZOLIN, M. R.; BAGGIO, D. Contaminação por ácaros em arroz polido e feijão comercializados a granel. **Revista da Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-83, 2000.

GARCIA, M. E. et al. Oral mite anaphylaxis mimicking acute asthma. **Allergologia et immunopathologia**, 2016.

GARCÍA, N. Efforts to control mites on Iberian ham by physical methods. **Experimental and Applied Acarology**, v. 32, n. 1, p. 41-50, 2004.

GILL, C. et al. House dust and storage mite contamination of dry dog food stored in open bags and sealed boxes in 10 domestic households. **Veterinary Dermatology**, v. 22, p. 162-172, 2011.

HARVEY, M. S. The neglected cousins: What do we know about the smaller Arachnid orders? **Journal of Arachnology**, v. 30, n. 2, p. 357-372, 2002.

HIBBERSON, C. E.; VOGELNEST, L. J. Storage mite contamination of commercial dry dog food in south-eastern Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 96, n. 6, p. 219-224, 2014.

HOOKE, S. C. W. **A national grain sampling and analysis system for improved food marketing and safety. HGCA Project Report n. 349.** Home Grown Cereals Authority. London, p. 92. 2004.

HUBERT, J. et al. Comparison of communities of stored product mites in grain mass and grain residues in the Czech Republic. **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, p. 149-158, 2006.

HUBERT, J. et al. Temperature Preference and Respiration of Acaridid Mites. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 6, p. 2249-2257, 2010.

HUGHES, M. **The mites of stored food and houses.** 2. ed. Londres: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Technical Bulletin, 1976. 400 p.

INSTITUTE OF MEDICINE. **DRI – Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc.** Washington, DC: National Academy Press, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físicos-químicos para análise de alimentos.** 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola Municipal.** Disponível em:
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo/acervo9.asp?e=c&p=PA&z=t&o=11>>.
Acesso em: 24 jul. 2016.

JEON, J. H.; LEE, C. H.; LEE, H. S. Food protective effect of geraniol and its congeners against stored food mites. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 7, p. 1468-1471, 2009.

KRANTZ, G. W. Some mites injurious to farm-stored grain. **Journal of Economic Entomology**, v. 48, p. 754-755, 1955.

KRANTZ, G. W. The biology and ecology of granary mites of the Pacific Northwest I. Ecological considerations. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 54, p. 169-174, 1961.

LIAO, E.-C. et al. *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Tyrophagus putrescentiae* Allergy in Allergic Rhinitis Caused by Cross-reactivity Not Dual-Sensitization. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, n. 6, p. 830-839, 2010.

LORINI, I. **Controle integrado de pragas de grãos armazenados**. EMBRAPA-CNPT (Documento nº 48). Passo Fundo, p. 52. 1998.

LOURES, M. A. R. et al. Guidelines of the Brazilian Society of Rheumatology for the diagnosis and treatment of osteoporosis in men. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, Supplement 2, p. 497-514, 2017.

MANGRAVITE, L. M.; CHIU, S.; WOJNOONSKI, K.; RAWLINGS, R. S.; BERGERON, N.; KRAUSS, R. M. Changes in atherogenic dyslipidemia induced by carbohydrate restriction in men are dependent on dietary protein source. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 12, p. 2180-2185, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003.

MORAES, G.; FLECHTMANN, C. H. W. **Manual de acarologia: Acarologia básica e plantas cultivadas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2008. 308 p.

MORESCHI, E. C. P. **Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006.

NADCHATRAM, M. House dust mites, our intimate associates. **Malaysian Society of Parasitology and Tropical Medicine**, v. 22, n. 1, p. 23-37, 2005.

NAYAK, M. K. Management of mould mite *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acarina: Acaridae): A case study in stored animal feed. **International Pest Control**, v. 48, n. 3, p. 128-130, 2006.

CONNOR, B. M. Evolutionary origins of astigmatid mites inhabiting stored products. **Recent Advances in Acarology**, v. 1, p. 273-278, 1979.

PACHECO, I. A.; PAULA, D. C. **Insetos de grãos armazenados identificação e biologia**. Campinas: Fundação Cargil, 1995. 228 p.

PALYVOS, N. E.; EMMANOUEL, N. G. Seasonal abundance and vertical distribution of mites in flat storage containing wheat. **Phytoparasitica**, v. 34, p. 25-36, 2006.

PALYVOS, N. E.; EMMANOUEL, N. G.; SALTANIS, C. J. Mites associated with stored products in Greece. **Experimental and Applied Acarology**, v. 44, n. 3, p. 213-226, 2008.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 3^a. ed. Londres, Nova York.: Springer, 2009.

POSTHUMUS, J.; BORISH, L. A 71-year-old man with anaphylaxis after eating grits. **Allergy & Asthma Proceedings**, p.33, n. 1, p. 1110-113, 2012.

QU, S. X. et al. Temperature-Dependent Development and Reproductive Traits of *Tyrophagus putrescentiae* (Sarcoptiformes: Acaridae) Reared on Different Edible Mushrooms. **Environmental Entomology**, p. 1-8, 2015.

REVSBECH, P.; DUEHOLM, M. Storage mite allergy among bakers. **Allergy**, v. 45, n. 3, p. 204-208, 1990.

SANCHEZ-BORGES, M. et al. Anaphylaxis from ingestion of mites: pancake anaphylaxis. **Allergy and clinical immunology**, v. 131, n. 1, p. 31-35, 2013.

SÁNCHEZ-RAMOS, I.; ÁLVAREZ-ALFAGEME, F.; CASTANERA, P. Effects of relative humidity on development, fecundity and survival of three storage mites. **Experimental and Applied Acarology**, v. 41, p. 87-100, 2007.

SINHA, R. N. Role of Acarina in the stored grain ecosystem. **Recent Advances in Acarology**, v. 1, p. 263-272, 1979.

SOLOMON, M. E. Tyroglyphid mites in stored products. Nature and amount of damage to wheat. **Annals of Applied Biology**, p. 280-289, 1946.

SOLOMON, M. E. Establishment, growth and decline of populations of the grain mite *Acarus siro* L. on a handful of wheat. **In: Proceedings of 2nd International Congress Acarology**, p. 255-260, 1969.

SOUSA, J. M. et al. Ácaros em Produtos Armazenados Comercializados em Supermercados e Feiras Livres da Cidade do Recife. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 2, p. 303-309, 2005.

STEJSKAL, V.; HUBERT, J. Risk of occupational allergy to stored grain arthropods and false pest-risk perception in Czech grain stores. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 15, n. 1, p. 29-35, 2008.

STORAAS, T. et al. Occupational rhinitis: diagnostic criteria, relation to lower airway symptoms and IgE sensitization in bakery workers. **Acta Otolaryngol**, v. 125, n. 11, p. 1211-1217, 2005.

TAKAHASHI, K. et al. Oral mite anaphylaxis caused by mite-contaminated okonomiyaki/ pancake-mix in Japan: 8 case reports and a review of 28 reported cases. **Allergology international: official journal of the Japanese Society of Allergology**, v. 63, n. 1, p. 51-56, 2014.

TAO, N. et al. Investigation of Acaroid mites breeding in stored dry fruits. **Chinese journal of schistosomiasis control**, v. 27, n. 6, p. 634-637, 2015.

THIND, B. B.; CLARKE, P. G. The occurrence of mites in cereal-based foods destined for human consumption and possible consequences of infestation. **Experimental and Applied Acarology**, v. 25, p. 203-215, 2001.

WALTER, D. E.; KRANTZ, G. **A Manual of Acarology**. 3. ed. Lubbock: Texas Tech University Press, 2009. 807 p.

WILKIN, D. R.; STABLES, L. The effects of dusts containing etrimfos, methacrifos or pirimiphos-methyl on mites in the surface layers of stored barley. **Experimental and Applied Acarology**, v. 1, p. 203-211, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Human Vitamin and Mineral Requirements**. Rome, 2002. 286p. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/ESN/Vitrni/vitrni.htm>>. Acesso em: 23 out. 2017.